第 44 卷 第 3 期
2001 年 8 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44, No.3
Aug., 2001

杆状病毒的结构蛋白及其功能

孙国勋，丁 翠*，蔡秀玉
（中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：综述了昆虫杆状病毒的主要结构蛋白及其功能。髓核是由大约 120 kb 的双链 DNA 分子和与其密切相关的碱性蛋白所组成，碱性蛋白同 DNA 紧密结合以维持其复杂有序的超螺旋结构，并且能够增强杆状病毒 DNA 的感染性；衣壳蛋白是杆状病毒粒子的主要结构蛋白，主要有 VP 39、VP 78/83、VP 87、VP 80、VP 24；囊膜蛋白有 PDV-E 25、PDV-6 e、PDV-E 66、PDV-E 56、PDV-E 18、PDV-EC 27、PDV-E 35、PDV-EC 27、BV/PDV-E 26、PDV-43、gp 64-67、VP 40/41；包涵体的基质蛋白；多角体（或颗粒体）膜主要是由糖类构成，VP 32-36 是与之相关的蛋白。

关键词：杆状病毒；结构蛋白；功能
中图分类号：Q965.8　**文献标识码**：A　**文章编号**：0454-6296（2001）03-0366-07

随着分子生物学的发展，人们发现以昆虫杆状病毒（主要是核型多角体病毒，nuclear polyhedrosis virus，NPV）为载体，昆虫或昆虫细胞为受体的外源基因表达系统具有以下优点：1）对外源基因容量大（估计可达 100 kb）；2）对人、畜和植物安全；3）病毒基因组能在非必须区提供多个位点（例如后期表达的多角体基因和 P10 基因）供外源基因插入，并不影响病毒自身的复制，同时提供极强的启动子（如多角体基因启动子），使插入的外源基因高效表达；4）有多角体这个特异性标记，便于重组病毒的挑选；5）能大规模低成本地饲养寄主昆虫，从而获得大量有重要经济价值或研究价值的外源基因表达产物；6）在虫体或培养的昆虫细胞中合成外源基因产物，具有翻译后的修饰作用（如糖基化或磷酸化作用），因而合成的蛋白较稳定，具有同天然蛋白相同的生理活性，这是细菌表达系统所不具备的。

另外，为更好地利用昆虫杆状病毒和重组昆虫杆状病毒防治农林害虫，以提高杀虫效果，都要求人们研究和了解该类病毒的结构和功能。

1 杆状病毒的基本特性

杆状病毒粒子是由杆状核衣壳（rod-shaped nucleocapsid）和包被它的二层脂蛋白囊膜（envelope）所组成，而核衣壳则包括蛋白的衣壳（capsid）和病毒 DNA 分子与碱性蛋白构成的髓核（core）。杆状病毒感染宿主细胞后能够产生两种类型的病毒：一种是包涵型病毒（occluded

基金项目：“九五”国家攻关项目（96-05-04-09-03）和农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室资助项目
* 通讯作者
收稿日期：1999-10-28；接受日期：2001-02-05

virus，OV)，又称多角体获得型病毒（polyhedron-derived virus，PDV)；另一种是芽生型病毒（budded virus，BV)，或称胞外病毒（extracellular virus，ECV)。在感染的细胞核中，一部分核衣壳外形成囊膜，多角体或颗粒体蛋白沉积于囊膜上，形成包涵体病毒。另一部分核衣壳通过出芽的方式从细胞质膜获得囊膜，形成芽生型病毒。包涵体衍生病毒主要进行昆虫之间的感染传播，而芽生型病毒则负责昆虫体内感染的扩散[1]。

根据囊膜中核衣壳数量的不同，可将多角体病毒粒子分为单粒包埋型和多粒包埋型。囊膜内含有一个核衣壳，称为单粒包埋型核型多角体病毒（single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus，SNPV)；囊膜内含有多个核衣壳，称为多粒包埋型核型多角体病毒（multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus，MNPV)。

2　髓核

髓核是由病毒 DNA 和与其密切相关的碱性蛋白所组成。杆状病毒的基因组是大约 120 kb 的双链 DNA 分子，约含有 80 个非重叠基因，其中 30 个基因编码病毒结构蛋白。结构蛋白的数量明显低于其基因组 DNA 编码的蛋白数，表明基因组含有编码具调节或酶活性的蛋白的基因[2]。目前已经完成苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒（*Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus，AcMNPV、冷杉合毒蛾核型多角体病毒（*Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus，OpMNPV）和家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori* nucleopolyhedro virus，BmNPV）的基因组全序列测定[3~5]。AcMNPV 基因组由 133 894 bp 组成，编码 337 个开放阅读框（open reading frame，ORF)，每个 ORF 至少由 150 个核苷酸组成。这些 ORF 均匀地分布于病毒基因组的两条链上，相邻排列，由较短的基因间隔区（short intergenic region）分开，互不重叠，编码 50 个或 50 个以上氨基酸组成的多肽。OpMNPV 基因组由 131 990 bp 组成，G + C为 55%，含有 152 个 ORF，每个 ORF 也由 150 个或更多的核苷酸组成。在基因组成和排列上，与 AcMNPV 最主要的不同是，OpMNPV 基因组含有 3 个完整的 Tap 同源基因，2 个 conotoxion 同源基因，2 个蛋白酪氨酸磷酸化同源基因和编码 dUTP 酶及核糖体大小亚基还原酶基因。BmNPV 基因组由 128 413 bp 组成，G + C 为 40%，含有 136 个 ORF。它与 AcMNPV 的同源性超过 90%。

碱性蛋白同 DNA 紧密结合以维持其复杂有序的超螺旋结构，此结构对于 DNA 在宿主细胞核中复制和包装进核衣壳中是必备的。此外，碱性蛋白能够增强杆状病毒 DNA 的感染性。

3　衣壳

衣壳蛋白是杆状病毒粒子的主要结构蛋白。VP 39 蛋白是衣壳的主要成分[6]，编码此蛋白的基因是杆状病毒较为保守的基因之一。VP 39 多肽链 C-末端相对来说是可变的，所含的 8 个半胱氨酸残基是保守的，它们能形成二硫键，此二硫键在维持 VP 39 蛋白的空间结构方面起着重要作用。在病毒感染晚期，VP 39 蛋白在细胞核内浓集，参与有丝分裂时的 DNA 浓缩过程[7]。

杆状病毒的核衣壳含有帽状末端结构，这个结构的蛋白组成明显不同于衣壳的其它部分，

VP 78/83 蛋白与此末端结构相关联[8]。VP 78/83 蛋白是由 543 个氨基酸组成的非糖蛋白，它以磷酸化和非磷酸化的两种形式存在。83 kD 蛋白是由 78 kD 多肽经翻译后修饰，即磷酸化形成[9]。此蛋白参与病毒复制的多个过程，包括核蛋白髓核的包装、在感染细胞核中核衣壳囊膜合成的启动、通过核膜及质膜的出芽等过程[8]。在核衣壳组装过程中，磷酸化的 VP 78/83 蛋白通过与核蛋白髓核或者其它结构蛋白相互作用而发挥作用。在病毒成熟过程中，磷酸化参与调节核衣壳与囊膜的相互作用[9]。

OpMNPV 的 VP 87 蛋白和与此相似的 AcMNPV 的 VP 80 蛋白也是衣壳的组成成分。曾发现预测分子量（70.6 kD）较实际测量的分子量（87 kD）低，推测可能为翻译后糖基化引起，但实际上此蛋白并不是糖蛋白。这种差异是何原因引起，有待进一步研究。比较这两个蛋白的氨基酸序列发现，它们 C-末端 1/3 是高度保守的，这个高度保守的区域在病毒装配过程中起着重要作用。而这两者之间的非保守区域则表现出更高的种属特异性，即对宿主的特异性[10,11]。

非糖蛋白 VP 24 也是衣壳的组分之一，但是末端结构不含此蛋白。在细胞培养条件下，VP 24的 ORF 对于病毒的复制是非必需的[12]。

4 包涵体型病毒粒子的囊膜

PDV-E 25 是 PDV 囊膜的组成成分。在病毒复制的过程中，此蛋白于晚期表达，并且被酯酰化。表达的蛋白出现于病毒发生基质（virogenic stroma）的边缘区，与细胞核内的病毒囊膜和包涵体膜相关联。蛋白的 N-末端有一个由 20 个氨基酸组成的高度疏水域，此高度疏水域使其定位于囊膜上。在包涵体形成过程中，它参与多角体蛋白的合成，并使多角体蛋白沉积于病毒粒子表面，形成包涵体。另外，它还可能参与病毒粒子与宿主昆虫的中肠细胞之间的相互作用，使病毒侵入宿主而引发感染[13~15]。

晚期表达的 PDV-6 e 蛋白也是 PDV 病毒粒子囊膜的成分，分子量为 38~40 kD。它有两个高度保守的区域：一个是跨膜域，另一个是富含半胱氨酸域。跨膜域可使其定位于 PDV 的囊膜上，而半胱氨酸则在蛋白的二级结构形成中起关键作用[16]。

PDV-E 66 是晚期基因编码的 66 kD 蛋白。转录是从两个保守的 TAAG 起始，在感染后 12~72 h 可检测到转录产物，在感染 24~72 h 可检测到蛋白。其 N-末端的 23 个氨基酸高度疏水，在感染的细胞核中，此疏水域足以引起微膜泡的形成，进而形成病毒囊膜[14,17,18]。

囊膜蛋白 PDV-E 56 的转录起始于保守的 ATAAG 序列，在感染 16~72 h 可检测到其转录产物，而在感染 36 h 后可检测到蛋白。蛋白转运及其定位的信号序列位于 C-末端[19]。

囊膜蛋白 PDV-E 18 和 PDV-EC 27 的转录起始于保守的 TAAG 序列，在感染 16~72 h 可检测到转录产物。其中 PDV-E 18 蛋白与另一囊膜蛋白 PDV-E 35 具有相同的 N-末端。PDV-EC 27 不仅存在于 PDV 囊膜，而且还是 PDV 衣壳的成分[20]。

BV/PDV-E 26 不仅是 PDV 囊膜的成分，同时也是 BV 囊膜的成分。在感染早期，它结合于质膜膜泡（cytoplasmic vesicles），感染 16 h 后，在细胞核中，与病毒诱导的核内微泡和 PDV 囊膜相关联[21]。另外，PDV-43 也是囊膜蛋白[17]。

5　芽生型病毒囊膜

gp 64-67 蛋白是芽生型病毒（BV）粒子囊膜的主要成分。它是由 529 个氨基酸组成的酸性磷酸化糖蛋白，是 BV 粒子囊膜膜粒（peplomers）的组成成分[22]。此蛋白拥有两个疏水区域：一个位于近 N-末端；另一个位于近 C-末端。N-末端疏水域有一由碱性氨基酸引导的、15 个氨基酸组成的信号肽，此信号肽在 gp 64-67 蛋白的翻译、翻译后修饰及运输过程中起着重要作用。C-末端疏水域起锚定作用（anchorage），此疏水域的 23 个氨基酸（500 ~ 522 位）形成跨膜片断（membrane-spanning segment），使 gp 64 锚定在质膜上。C-末端剩余的 7 个氨基酸形成短尾，其中 3 个为碱性精氨酸，这个短尾结合到病毒的核衣壳上，起稳定病毒结构作用。gp 64 是酯酰化蛋白，其酯化部位靠近病毒粒子表面，而蛋白酶对 gp 64 的水解作用发生于此，酯酰化结果能够保护蛋白免于蛋白水解作用的发生[23,24]。另外，蛋白的酯酰化作用在膜锚定、膜融合、蛋白在细胞内转运的调节等方面起着重要作用。gp 64 是一种膜融合蛋白，能够识别宿主细胞膜表面的受体并与之结合，这样，病毒通过细胞内吞作用侵入宿主细胞中[25]。

VP 40/41 是糖蛋白，至于它是 PDV 粒子囊膜的组成成分，还是存在于 PDV 粒子囊膜与核衣壳之间，目前还无定论。比较 SfMNPV、AcMNPV、BmNPV 和 HzNPV，发现它们的核苷酸序列有 60% 的同源性，氨基酸序列有 70% 的相似性。在此蛋白的氨基酸序列中，对二级结构起关键作用的脯氨酸和半胱氨酸残基的相对位置是保守的。几种病毒 VP 40 蛋白的亲水性分布图（hydrophilic profiles）是相似的。这表明它们的二级结构和三级结构是相似的。对于其相应的功能来说，这种结构上的保守是重要的[26,27]。

6　包涵体的基质蛋白

多角体蛋白或颗粒包被于 PDV 病毒囊膜之外，形成包涵体。它是杆状病毒的主要结构成分，具有两个主要功能：一是围绕病毒形成保护性的晶体；二是能抵抗强碱性条件以外的溶解作用。这两个功能特性，允许杆状病毒在宿主昆虫的体外保存多年。

包涵体蛋白的 N-末端序列变异较大。在颗粒体蛋白中有 2 ~ 3 个附加于 N-末端的氨基酸，而多角体蛋白则未发现。多角体蛋白与颗粒体蛋白在氨基酸序列的保守程度上要较多角体蛋白与多角体蛋白、颗粒体蛋白与颗粒体蛋白之间的保守程度为低[28]。这反映了多角体蛋白与颗粒体蛋白在血清学和形态发生学上的差异。

包涵体蛋白的疏水区和亲水区是高度保守的。亲水区域暴露于蛋白的表面，并且具有高度的极性，因此具有成为抗原决定簇的倾向。多角体蛋白（181 位）和颗粒体蛋白（185 位）中亲水区域的保守组成，表明这些蛋白具有相似的结构，这就决定了它们具有相似的功能和生物学特性[29,30]。

7　多角体（或颗粒体）膜

在包涵体表面有一种膜结构，称为多角体或颗粒体膜。但它并不是真正的生物膜，因为

它不具有膜脂双层结构。此结构主要是由糖类构成，VP 32-36 蛋白是与此囊膜相关的蛋白[31,32]。

精氨酸-丝氨酸重复序列是 AcMNPV 的多角体膜蛋白亲水区的主要组成成分，而在 OpMNPV 则主要由脯氨酸-丝氨酸重复序列组成。在每个蛋白的亲水区存在有半胱氨酸残基簇，这些半胱氨酸通过二硫键把蛋白连接到多角体膜上，而重复序列通过增强亲水区的亲水性使半胱氨酸更易于连接到多角体膜上。在氨基酸序列当中，OpMNPV 的 PCPQP 重复序列于 AcMNPV 同源区序列区的 PHCRP 序列相似，这些富含脯氨酸重复序列的存在，说明了它在这些蛋白的结构和功能中起着重要作用。

目前，人们只是勾画出杆状病毒结构的框架，对其相应的功能了解的还不够深入，相信随着科学技术的进步，人们能更为详尽地了解它的结构和功能特性。

致谢 承蒙钦俊德院士审阅初稿，谨致衷心感谢！

参 考 文 献（References）

[1] Keddie B A, Volkman L E. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: importance of the 64K glycoprotein. J. Gen. Virol., 1985, 66: 1 195～1 200

[2] Blissard G W, Rohrmann G F. Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol., 1990, 35: 127～155

[3] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J *et al*. The complete DNA sequence of *Autographa califonica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1994, 202: 586～605

[4] Ahrens C H, Russell R L, Funk C J *et al*. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1997, 229: 381～399

[5] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol., 1999, 80: 1 323～1 327

[6] Bjornson R M, Rohrmann G F. Nucleotide sequence of the P39-capsid gene region of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol., 1992, 73: 1 505～1 508

[7] Russell R L, Pearson M N, Rohrmann G F. Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins. J. Gen. Virol., 1991, 72: 275～283

[8] Fraser M J. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res., 1986, 95: 185～195

[9] Vialard J E, Richardson C D. The 1629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein. J. Virol., 1993, 67: 5 859～5 866

[10] Lu A, Carstens E B. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1991, 181: 336～347

[11] Lu A, Carstens E B. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the P80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene. Virology, 1992, 190: 201～209

[12] Wolgamot G M, Gross C H, Russell R L *et al*. Immunocytochemical characterization of P24, a baculovirus capsid-associated protein. J. Gen. Virol., 1993, 74: 103～107

[13] Harrison R L, Jarvis D L, Summers M D. The role of the AcNPV 25k gene, “FP25”, in baculovirus polh and P10 expression. Virology, 1996, 226: 34～46

[14]　Hong T，Summers M D，Braunagel S C. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1997，94：4 050～4 055

[15]　Harrison R L，Summers M D. Mutations in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion，altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. J. Gen. Virol.，1995，76：1 451～1 459

[16]　Theilmann D A，Chantler J K，Stewart S *et al*. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions. Virology，1996，218：148～158

[17]　Braunagel S C，Summers M D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus，PDV，and ECV viral envelopes and nucleocapsids：structural proteins，antigens，lipid and fatty acid profiles. Virology，1997，202：315～328

[18]　Hong T，Braunagel S C，Summers M D. Transcription，translation，and cellular localization of PDV-E66：a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology，1994，204：210～222

[19]　Braunagel S C，Elton D M，Ma H *et al*. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope：ODV-E56. Virology，1996，217：97～110

[20]　Braunagel S C，He H，Ramamurthy P. Transcription，translation，and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins：ODV-E18，ODV-E35，and ODV-EC27. Virology，1996，222：100～114

[21]　Beniya H，Braunagel S C，Summers M D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus：subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelope. Virology，1998，240：64～75

[22]　Charlton C A，Volkman L E. Effect of tunicamycin on structural proteins and infectivity of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology，1986，154：214～218

[23]　Roberts T E，Faulkner P. Fatly acid acrylation of the 67K envelope glycoprotein of a baculovirus：*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology，1989，172：377～381

[24]　Whitford M，Stewart S，Kuzio J *et al*. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67，an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol.，1989，63：1 393～1 399

[25]　Blissard G W，Wenz J R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. J. Virol.，1992，66：6 829～6 835

[26]　Liu J C，Maruniak J E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the gp41 gene of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol.，1995，76：1 443～1 450

[27]　Ma S W，Corsaro B G，Klebba P E *et al*. Cloning and sequence analysis of a P40 structural protein gene of *Helicoverpa zea* nuclear polyhedrosis virus. Virology，1993，192：224～233

[28]　Cowan P，Bulach D，Goodge K *et al*. Nucleotide sequence of the polyhedrosis gene region of *Helicoverpa zea* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus：placement of the virus in *Lepidoptera nuclear* polyhedrosis virus group Ⅱ. J. Gen. Virol.，1994，75：3 211～3 218

[29]　Rohrmann G F. Polyhedrin structure. J. Gen. Virol.，1986，67：1 499～1 513

[30]　Akiyoshi D，Chakerian R，Rohrmann G F *et al*. Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. Virology，1985，141：328～332

[31]　Gombart A，Pearson M，Rohrmann F *et al*. A baculovirus polyhedral envelope-associated protein：genetic location，nucleotide sequence，and immuno-cytochemical characterization. Virology，1989，169：182～193

[32]　Whitt M A，Manning J S. A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbhydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. Virology，1988，163：33～42

Structural proteins of baculovirus and their functions

SUN Guo-xun, DING Cui, CAI Xiu-yu
(State Key Laboratory of Integrated Management of Insects and Rodents, Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Structural proteins of baculovirus and their functions are reviewed. Core of the virus is composed of supercoiled dsDNA genome proximately 120 kb in size and related basic proteins which couple with the genome DNA to maintain its complexity and enhance its infectivity. Capsid proteins are the main structural proteins of the virus, which include VP39, VP78/83, VP87, VP80 and VP24. Envelope proteins include PDV-E25, PDV-6e, PDV-E66, PDV-E56, PDV-E18, PDV-EC27, PDV-E35, PDV-EC27, BV/PDV-E26, PDV-43, gp64-67 and VP40/41. The paper also presents some other important structural proteins of the virus.

Key words: baculovirus; functions; structural proteins